

VERGLEICHENDE METHODISCHE
UNTERSUCHUNGEN ZUR WERTIGKEIT
VON SPERMIENMIGRATIONS-
UND
HAMSTEROVUM-PENETRATIONSTEST

Sylvia Langgartner

*Ass
München
1986*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER I. FRAUENKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. MED. J. ZANDER

VERGLEICHENDE METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR WERTIGKEIT
VON SPERMIENMIGRATIONS- UND HAMSTEROVUM-PENETRATIONSTEST

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON
SYLVIA LANGGARTNER

AUS
MÜNCHEN

JAHR

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Zander

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13. 5. 1986

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. J. Zander für die
Überlassung des Themas und Herrn Dr. Palm für die
Betreuung der Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

=====

	Seite
I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
II. METHODIK	6
II.1. Population	6
II.2. Photomikrographische Dokumentation der Spermienbewegung	6
II.3. Migrationstest	9
II.4. Fusionstest	11
II.4.1. Präparation der Spermien suspension	11
II.4.2. Präparation der Hamstereizellen	14
II.4.3. Hamstereizell-Spermien-Reaktion	15
II.4.4. Anfärbung und Beurteilung der Oozyten	15
II.4.5. Auswertung der Oozyten	16
III. ERGEBNISSE	17
III.1. Statistische Auswertung	17
III.2. Motilität der Spermatozoen im Testsystem	17
III.2.1. Präzision der Methode	17
III.2.2. Einfluß des Präparationsverfahrens auf die Motilität	17
III.3. Vergleich migrations- und ejakulat- spezifischer Parameter	18
III.4. Fusionsraten im Hamsteroovum-Penetrations- test	19
III.4.1. Vergleich Motilität und Ergebnisse im Hamsteroovum-Penetrationstest	19
III.4.2. Vergleich Fusionsraten mit Ejakulat- und Migrationsparametern	20
IV. DISKUSSION	25
V. ZUSAMMENFASSUNG	31
VI. LITERATURVERZEICHNIS	32

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Durch die 1978 von den britischen Mediziner Patrick Steptoe und Robert Edwards erstmals erfolgreich durchgeführte in-vitro-Fertilisation der menschlichen Eizelle (17) haben sich in den letzten Jahren neue Perspektiven bei der Behandlung der Sterilität eröffnet. Die Methode ist insbesondere bei Störungen des Eitransports durch pathologisch veränderte Eileiter indiziert. Die Aufwendigkeit des Verfahrens sowie auch die damit verbundenen gesundheitlichen Risiken für die Patientinnen erfordern zur Einschätzung des Behandlungserfolgs und zur Patientenauswahl eine vorherige Abklärung eventuell bestehender andrologischer Fertilitätsstörungen. Daneben ist die Indikation zur extrakorporalen Befruchtung auch aus andrologischer Sicht denkbar, da unter in-vitro-Bedingungen durch spezielle Anreicherungs- und Präparationsverfahren, etwa im Falle einer Oligozoospermie, eine Verbesserung der Spermienqualität erreicht werden kann (23). Nach bisherigen klinischen Erfahrungen kann unter einer Spermatozoendichte von 10 Mio/ml und weniger als 10 % Progressivmotilität i.a. nicht mehr mit einer natürlichen Befruchtung gerechnet werden (49). Die Grenzen zwischen Subfertilität und Infertilität sind jedoch fließend; bei eingeschränkter Samenqualität können zum Beispiel banale Infekte oder Lebensgewohnheiten, wie Alkohol- und Nikotingenuß oder

körperliche und seelische Belastungen von ausschlaggebender Bedeutung sein.

Um eine möglichst präzise Prognose stellen zu können, sind neben den wesentlichen Spermio Gramm-Parametern, wie Spermatozoendichte, -motilität und -morphologie, zusätzliche Informationen über phasenspezifische Fertilisationsmechanismen notwendig.

Das Ziel dieser Arbeit war, einzelne Vorgänge der Spermienmigration und -fertilisation durch ein kombiniertes in-vitro-Testsystem exemplarisch nachzuvollziehen. Dabei wurden folgende Methoden vergleichend angewandt:

1. Photomikrographische Dokumentation der Spermienmotilität

Hier sollte die Motilität der Spermatozoen im Ejakulat, im standardisierten Rindermukus und nach selektiver Spermienpräparation (für den Hamsterovum-Penetrationstest) durch zeitversetzte photomikrographische Dokumentation der Spermienbewegung im Dunkelfeld erfaßt werden (32). Spermindichte und -morphologie wurden in üblicher Weise bestimmt (27,28).

2. Migrationstest im standardisierten Rindermukus

Dabei wurde das Wanderungsverhalten der Spermatozoen im standardisierten Rindermukus untersucht (26).

3. Heterologer Fusionstest zwischen Humanspermatozoen und Zona-pellucida-freien Hamstereizellen

Durch dieses Testverfahren wird die Fusionskapazität einer Spermatozoenpopulation mit Zona-pellucida-freien Eizellen bewertet.

Die Fähigkeit zur Spermienmigration und Penetration der Zona pellucida wird sehr wesentlich von der Motilität der Spermatozoen beeinflusst, während die Fusionskapazität weitgehend durch Membraneigenschaften im Bereich des Spermienkopfes bestimmt wird (10, 43,44,45). Da lebende menschliche Eizellen im allgemeinen aus ethischen Gründen für dieses Verfahren nicht zur Verfügung stehen können, müssen die Nachteile eines Tiermodells in Kauf genommen werden. Dabei stellt sich zunächst das Problem, die Barriere gegen artfremde Befruchtung aufzuheben (46). Bei den meisten Säugetierarten bestimmt vorwiegend die Zona pellucida, eine die Eizelle umgebende Glycoproteinhülle, die Speziespezifität des Befruchtungsvorgangs. Aber auch nach Ablösung dieser Hülle ist bei den meisten Säugetieren das Eindringen artfremder Spermatozoen in die Eizelle nicht möglich (34). Eine Ausnahme bildet hier der Goldhamster, dessen Zona-pellucida-freie Oozyten von einer Vielzahl artfremder - und bisher einzigartig auch menschlicher - Spermatozoen penetriert werden können (45). Seit 1970 wurden, ins-

besondere von Yanagimachi, zahlreiche Untersuchungen über Fertilisierungsmechanismen unter Verwendung der Zona-pellucida-freien Hamstereizelle erstellt (6,7,8, 22,24,33,35,36,42,43,44,45).

Als Vorbedingung für die Fusion von Spermatozoon und Säugetier-Eizelle muß der "Kapazitationsprozeß" und die Akrosomreaktion durchlaufen werden (4,5,14). Bei der Kapazitation scheint es zur Lösung einer reversiblen Enzym-Inhibitor-Komplexbildung zu kommen, die unmittelbar post ejaculationem zwischen Inhibitoren aus dem Seminalplasma und dem im Kopf des Spermatozoons lokalisierten Akrosin, einem trypsinähnlichen Enzym, eingegangen wird (19). Bei der Akrosomreaktion, deren biochemischer Mechanismus derzeit noch unzureichend geklärt ist, wird das trypsinähnliche akrosomale Enzym mit anderen Enzymen freigesetzt.

In vivo kommt es bei der Wanderung der Spermatozoen durch den weiblichen Genitaltrakt zur Kapazitation. Dieser Prozeß steht wahrscheinlich unter hormoneller Kontrolle (39). Die Dauer des Kapazitationsvorgangs variiert speziesabhängig und liegt beim Menschen im Bereich mehrerer Stunden (5,14,38). In vitro kann die Kapazitation bei verschiedenen Spezies über Waschvorgänge mit Kulturmedien unterschiedlicher Zusammensetzung erreicht werden; beim Menschen ist dies relativ einfach möglich (14).

Die Untersuchungen von Yanagimachi (45) ergaben, daß Kapazitation und Akrosomreaktion auch nach Entfernung der Zona pellucida zur Penetration der Hamstereizelle unbedingt erforderlich sind. Erst die Akrosomreaktion befähigt das Spermatozoon, mit der Eizellmembran zu reagieren (42).

Kurz nach dem Eindringen des Spermatozoons in die Eizelle kommt es zu Veränderungen der Eizellmembran und der Zona pellucida, wodurch die Penetration bzw. Fusion weiterer Spermatozoen verhindert wird (Plasma-Membran-Block bzw. Zona-Reaktion, 10). Je nach Speziesart sind Plasma-Membran-Block, Zona-Reaktion oder beide gemeinsam für die Verhinderung einer Polyspermie verantwortlich. Bei der Hamstereizelle ist der Zona-Block die entscheidende Reaktion (6). Nach Ablösung der Zona pellucida können mehrere Spermatozoen in die Eizelle eindringen. Die Fusion mit den Human-Spermatozoen kann dann sogar zur Pronukleusbildung bzw. zum Zweizellstadium führen. Eine weitere Entwicklung erscheint aufgrund der großen genetischen Unterschiede nicht möglich (12).

II. METHODIK

II. 1. Population

In einer Pilotstudie wurden primär 37 Ejakulate untersucht. In der eigentlichen Untersuchung wurden dann 41 Ejakulate, zum Teil von fertilen Spendern sowie von Sterilitätspatienten, verwendet.

II. 2. Photomikrographische Dokumentation der Spermienbewegung

Die von den Spendern erhaltenen Ejakulate wurden bei 37°C in einer Atmosphäre von 95 % Luftfeuchtigkeit bei 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Unmittelbar nach der Verflüssigung der Ejakulate wurde unter temperaturstabilen Bedingungen (37°C) durch zeitversetzte Dunkelfeld-Photomikrographie die Motilität der Spermatozoen im Nativejakulat in Anlehnung an das von Overstreet und Mitarbeitern beschriebene Verfahren (32) erfaßt. Unter Verwendung verschiedener Objektive und Belichtungszeiten (x 10 mit 2 sec., x 20 mit 1 sec.) wurden von jeweils 10 µl des Ejakulats wenigstens vier Photographien aus verschiedenen Gesichtsfeldern erstellt (siehe Abb.1). In gleicher Weise wurde die Motilität der eingewanderten Spermatozoen im Rindermukus (Flachkapillare) und in der präparierten Spermien suspension erfaßt. Dazu wurden ein Leitz-Durchlichtmikroskop, eine Olympus-Kamera und Ilford-HP-5-Filme verwendet. Nach Entwicklung des Films und Projektion des Nega-

tivs auf einen 36 x 34 cm großen Plastik-Schirm wurde die Durchschnittsgeschwindigkeit der beweglichen Spermatozoen im Ejakulat ($\bar{v}_E$), im Rindermukus ($\bar{v}_M$) und in der Suspension ($\bar{v}_F$) sowie die quantitative Motilität im Ejakulat ($\%mS$) und in der Suspension (MSF) bestimmt. Die Länge der Spermienbewegungen pro Zeiteinheit wurde über einen Landkarten-Kilometerzähler ermittelt (s. Abb. 2).

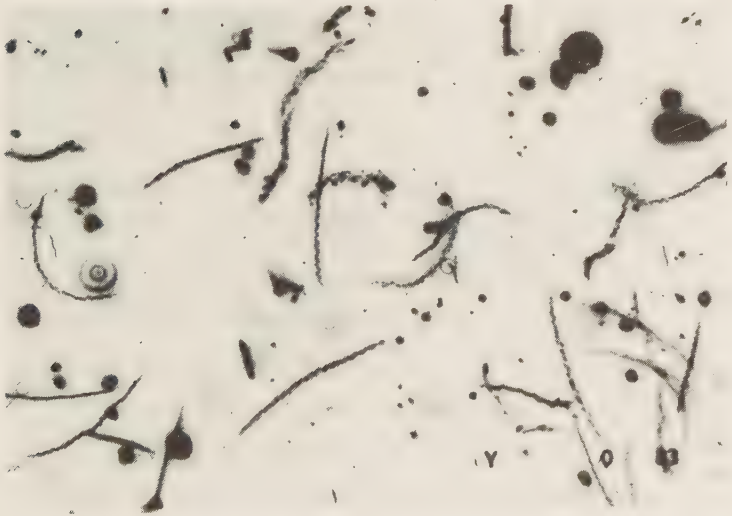


Abb. 1: Zellbewegung im Ejakulat

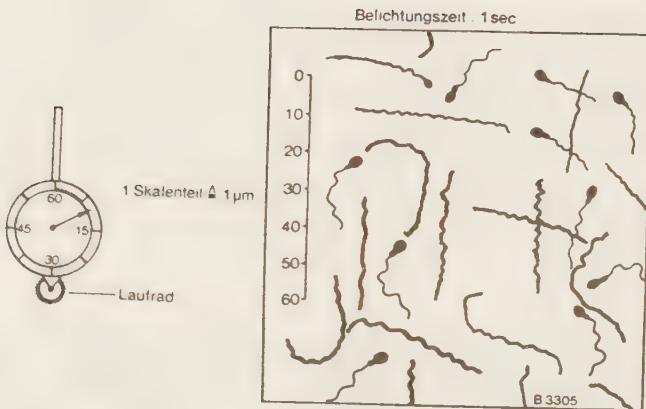


Abb. 2: Auswertung der quantitativen und qualitativen Motilität

II.3. Migrationstest

a) Allgemeine Bemerkungen

Durch die zyklusabhängige Qualität und die limitierte Verfügbarkeit von menschlichem Zervikalmukus wird eine objektive Bewertung der Spermienfunktion im Humanmukus erschwert. Deshalb wurde in dieser Untersuchung präovulatorischer Rindermukus verwendet, der in großen Quantitäten verfügbar ist und mit dem menschlichen Cervikalmukus Ähnlichkeiten in der chemischen Struktur aufweist (26).

b) Versuchsvorbereitung

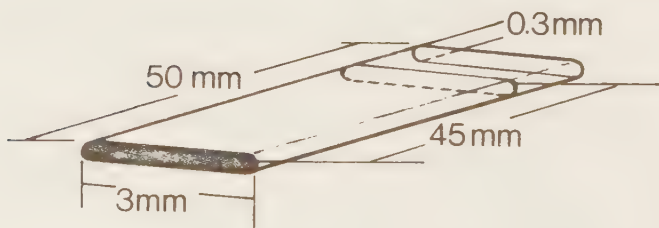
Aus entnommenen Genitaltrakten frisch geschlachteter Rinder wurde klarer, gut spinnbarer Östrusmukus gewonnen. Durch Verdünnung mit 1,5 Teilen Kulturmedium (BWW nach Biggers, Whitten und Whittingham 12) unter Zusatz von 5 Vol% Humanalbumin konnten optimale rheologische Bedingungen erzielt werden (26). Kontaminierte Zellen wurden durch Zentrifugation (3000 g, 20 min.) weitgehend eliminiert. Aliquotierte Mukusproben wurden bei -40°C gelagert und bei Bedarf aufgetaut.

c) Ablauf

Die Migration der Spermatozoen erfolgte in Flachkapillaren, in die der aufgetaute Rindermukus auf-

gezogen wurde (siehe Abb.3). Die Kapillaren wurden dabei nahezu senkrecht in jeweils 50 μ l Ejakulat getaucht und 30 min. inkubiert (95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO_2 -Gehalt, 37°C). Pilotstudien hatten ergeben, daß unter diesen Bedingungen eine geordnete parallele Migration entsprechend der in-vivo-Situation zu erwarten ist (9). Nach etwa 40 min. registriert man jedoch bei Proben mit hoher Spermienkonzentration ein ungeordnetes Migrationsverhalten, das möglicherweise durch eine Destruktion der Glycoproteine des Mukus über Enzyme des Seminalplasmas und/oder des Spermienakrosoms bewirkt wird. Nach Entfernung des Mukus aus den Kapillaren und Mukolyse in 0,3 % igem Dithioerythrol wurde die Konzentration der eingewanderten Spermien pro μ l Mukus bei vorgegebenem Volumen bestimmt.

FLACH-KAPILLARE



Microslides CAMBLAB
CAMBRIDGE

Abb. 3: Spermienmigration in Flachkapillaren

II.4. Fusionstest

II.4.1. Präparation der Spermien suspension

- a) In einer Pilotstudie mit 37 Ejakulaten wurden primär die Spermatozoen in Anlehnung an die von Rogers (35) publizierte Arbeit durch dreimaliges Waschen (Zentrifugation jeweils 5 min. bei 600 xg) präpariert und dann auf eine Konzentration von 10^7 Spermatozoen pro ml eingestellt.
- b) Eine wesentlich verbesserte Spermienqualität jedoch wurde durch eine von Overstreet (33) beschriebene Präparationsmethode ("swim-up") erreicht:

Je nach Ejakulatmenge wurden 5 bis 10 Reagenzgläser mit 4 ml Kulturmedium gefüllt, dem 0,5 ml Ejakulat unterschichtet wurde. Dazu wurden die Reagenzgläser in einem Winkel von 30° zur Horizontalen gelagert und 60 Minuten lang inkubiert (95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO_2 , 37°C). Danach wurden die in das Kulturmedium eingewanderten Spermatozoen durch Abpipettierung der Überstände (jeweils ca. 3 ml) gewonnen. Nach Zentrifugation der Überstände bei 500 xg über 10 Minuten wurde das Präzipitat auf das vorherige Volumen resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die nun erhaltenen Präzipitate des je-

weiligen Ejakulats wurden dann durch Verdünnung mit Kulturmedium auf die gewünschte Spermienkonzentration eingestellt.

Durch diese, im folgenden als "swim-up"-Methode bezeichnete Präparation konnte eine Spermienpopulation mit sehr geringer Zellkontamination und einer relativ beständigen Qualität erhalten werden.

Bei Verwendung der "swim-up"-Methode nach Overstreet (33) ließ sich bei Patienten mit guten Ejakulatparametern ab einer Konzentration von 10^6 Spermien/ml keine wesentliche Steigerung der Fusionsraten im Hamsteroovum-Penetrationstest erreichen (siehe Abb.4).

Die präparierten Spermatozoen wurden für drei Stunden im Brutschrank vorinkubiert (95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO_2 , $37^\circ C$), wobei ca. $100 \mu l$ Spermiesuspension im Mikrodropletverfahren nach Biggers (12) in begastes (CO_2) und sterilisiertes Paraffinöl eingebracht wurden. Nach der Vorinkubation wurden die Hamstereizellen in die Spermatozoensuspension übertragen.

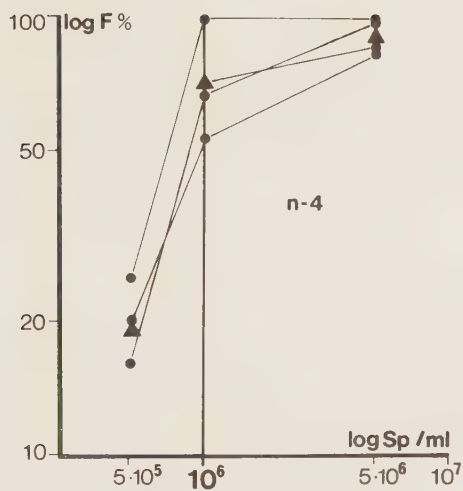


Abb. 4: Kinetik Hamsterovum-Penetrationstest

II.4.2. Präparation der Hamstereizellen

II.4.2.1. Versuchstiere

Zum Fusionstest wurden 8 bis 12 Wochen alte weibliche Goldhamster eingesetzt. Durch die zyklusgerechte subkutane Injektion von 30 IU PMG und nach 56 Stunden von 30 IU hCG konnten etwa 30 Oozyten pro Tier durch Superovulation gewonnen werden.

II.4.2.2. Isolierung der Cumuli oophori

15 Stunden nach der hCG-Injektion wurden die Hamstereizellen in Anlehnung an die von Yanagimachi und Mitarbeitern beschriebene Methode (45) präpariert. Zunächst wurden die Tuben entfernt und in eine mit Kulturmedium (BWW) gefüllte Petrischale übertragen, dann wurden die Cumuli mikrochirurgisch isoliert und gesammelt.

II.4.2.3. Auflösung der Cumuluszellen

Durch Zugabe von 0,1 %iger Hyaluronidase lösten sich in ca. 5 min. die Cumuluszellen auf. Die dabei sichtbar werdenden Eizellen wurden nun durch dreimaliges Umpipettieren in frischem Kulturmedium gewaschen.

II.4.2.4. Entfernung der Zona pellucida

Die Entfernung der Zona pellucida erfolgte in proteinfreiem BWW in Gegenwart von 0,02 % TLCK-

Chymotrypsin aus Rinderpankreas (Fa. Serva, Heidelberg). Dies erschien für die Eizellen wesentlich schonender als die Verwendung von Trypsin. Die einige Minuten dauernde Ablösung der Zona pellucida wurde unter dem Stereo-Mikroskop beobachtet. Anschließend wurden die Eizellen erneut dreimal in Kulturmedium gewaschen.

II.4.3. Hamstereizell-Spermien-Reaktion

Pro Ejakulat wurden mindestens 20 Hamstereizellen mit der vorbereiteten Spermien suspension inkubiert. Nach drei Stunden wurden die Eizellen dreimal in PBS gewaschen und anschließend in phosphatgepuffertem Glutaraldehyd (1 %, pH 7,4) fixiert.

II.4.4. Anfärbung und Beurteilung der Oozyten

Die Eizellen wurden dann in frisches Kulturmedium übertragen und mit 1 %igem Acetolacmoid angefärbt, um morphologische Details besser erkennen zu können. Jeweils etwa fünf der angefärbten Eizellen wurden mit einem geringen Flüssigkeitsvolumen innerhalb eines kleinen Ringes aus Vaseline übertragen, der auf einem Objektträger aufgebracht war. Darüber wurde unter mikroskopischer Kontrolle ein Deckglas so weit angepreßt, bis eine optimale lichtmikroskopische Durchlässigkeit erreicht war und das Präparat anschließend mit farblosem Nagellack versiegelt.

II.4.5. Auswertung der Oozyten

Die Fusion der Hamstereizellen mit den Spermatozoen wurde unter interferenz- und phasenkontrastmikroskopischen Bedingungen beurteilt. Kriterium für den Fusionserfolg war mindestens ein penetriertes, dekondensiertes Spermatozoon oder die Pronukleusbildung (siehe Abb. 5).

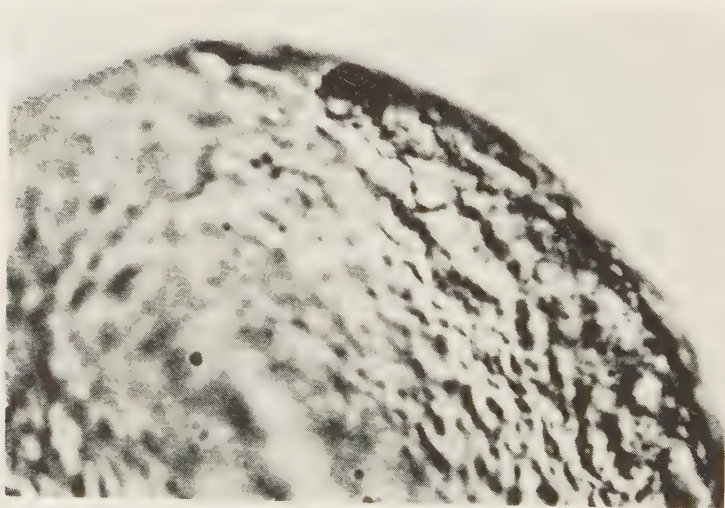


Abb. 5

III. ERGEBNISSE

III.1. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte über ein computerisiertes System (Savod Q), wobei sämtliche erhobenen Parameter miteinander in Beziehung gesetzt und Korrelationskoeffizient sowie Signifikanz (p) errechnet wurden (siehe Tabelle 1).

III.2. Motilität der Spermatozoen im Testsystem

III.2.1. Präzision der Methode

Für die einzelnen Motilitätsparameter ergaben sich in Abhängigkeit von der Spermienkonzentration Varianzen zwischen $\pm 2,5$ und $\pm 4,2$ %.

III.2.2. Einfluß des Präparationsverfahrens auf die Motilität

Der Gesamtdurchschnitt der Motilität der beweglichen Spermatozoen im Nativejakulat ($\bar{VE}$) betrug $45,3 \mu\text{m}/\text{sec.} \pm 30,3$ %. Der Anteil der motilen Spermienfraktion im Ejakulat ($\%mS$) belief sich auf $50,3$ % ± 47 %.

Durch die selektive Präparation der Spermatozoen mit der "swim-up"-Methode konnte der Anteil der motilen Spermien in der Suspension (MSF) auf durchschnittlich $83,5$ % ± 21 % gesteigert werden. Die Motilität der beweglichen Spermatozoen in der Suspension erhöhte sich auf durchschnittlich $53,2 \mu\text{m}/\text{sec.} \pm 31$ %.

Der Gesamtdurchschnitt der Motilität aller Spermatozoen im Ejakulat ($\bar{VE}\%$) betrug $22,8 \mu\text{m}/\text{sec.}\% \pm 60 \%$; der Gesamtdurchschnitt der Motilität aller Spermatozoen in der Spermiesuspension ($\bar{VF}\%$) $45,3 \mu\text{m}/\text{sec.}\% \pm 35 \%$, so daß sich durch das Präparationsverfahren mit der "swim-up"-Methode eine durchschnittliche Verbesserung der Motilität aller Spermatozoen um nahezu 100 % ergab.

Bei dem Vorversuch mit 37 Ejakulaten, die lediglich dreimal mit Kulturmedium gewaschen wurden, erhöhte sich im Gesamtdurchschnitt der Anteil der motilen Spermatozoen durch das Präparationsverfahren nicht wesentlich (siehe Tabelle 2).

III.3. Vergleich migrations- und ejakulatspezifischer Parameter

Zwischen der Konzentration der eingewanderten Spermatozoen im standardisierten Rindermukus (CM) und den meisten Ejakulat-Parametern ergaben sich signifikante Korrelationen (siehe Abb.7).

Die Dichte im Mukus (CM) wurde durch die Konzentration der Spermatozoen im Ejakulat (CE) signifikant beeinflusst ($p = 0,001$). Ebenso ergaben sich zwischen CM und der Durchschnittsgeschwindigkeit der motilen Spermatozoen im Ejakulat ($\bar{VE}$, $P = 0,018$), der Durchschnittsgeschwindigkeit aller Spermatozoen

im Ejakulat ($\bar{V}E\%$; $p = 0,042$) und dem Anteil morphologisch normaler Spermatozoen (PM; $p = 0,004$) signifikante Korrelationen. Die Konzentration der eingewanderten Spermatozoen stand ebenfalls in enger Beziehung mit der Migrationsgeschwindigkeit ($\bar{V}M$; $p = 0,02$).

III.4. Fusionsraten im Hamsterovum-Penetrationstest

III.4.1. Vergleich Motilität und Ergebnisse im Hamsterovum-Penetrationstest

Durch das selektive Präparationsverfahren der Spermatozoen mit der "swim-up"-Methode wurden Spermienpopulationen von verhältnismäßig homogener hoher Motilität gewonnen, so daß eine Beeinflussung der Fusionsraten im Hamsterovum-Penetrationstest durch unterschiedliche Motilitäten nicht im Vordergrund stand. Bei der statistischen Auswertung fanden sich keine signifikanten Beziehungen zwischen Fusionsrate und den Motilitätsparametern (Motilität der beweglichen Spermatozoen im Ejakulat ($\bar{V}E$) und in der Spermiesuspension ($\bar{V}F$), Anteil der motilen Spermatozoen im Ejakulat ($MS\%$) und in der Suspension (MSF), Motilität aller Spermatozoen im Ejakulat ($VE\%$) und in der Suspension ($VF\%$)).

Wurden die Spermatozoen ohne Verwendung des "swim-up"-Schrittes lediglich durch Zentrifugation ge-

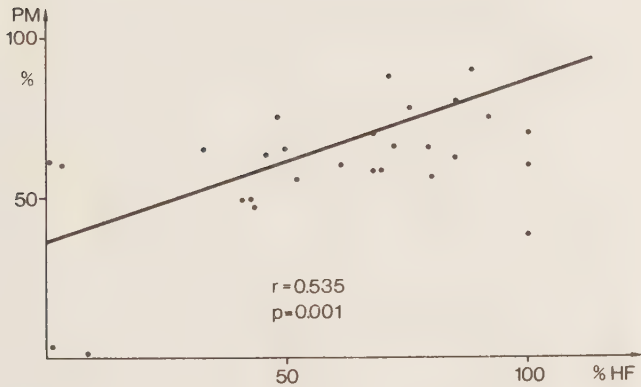
waschen, so fand sich auch keine Korrelation zwischen Fusionsraten und der Motilität der Spermatozoen.

Bei der "swim-up"-Methode lag die durchschnittliche Fusionsrate bei $60,8 \pm 47\%$. Im Pilotversuch mit der reinen Präzipitationsmethode wurde nur eine durchschnittliche Fusionsrate von $35,9\% \pm 30\%$ beobachtet. Obwohl es sich hier nicht um eine identische Population handelt, scheint eine erhöhte Fusionsrate gegenüber den Ergebnissen aus der Pilotstudie gegeben. Dies wird umso deutlicher, wenn man berücksichtigt, daß teilweise Ejakulate derselben Spender getestet wurden.

III.4.2. Vergleich Fusionsraten mit Ejakulat- und Migrationsparametern

Beim statistischen Vergleich zwischen Fusionsraten (HF) und ejakulatspezifischen Parametern ergab sich eine hochsignifikante Korrelation ($p = 0,001$) mit dem prozentualen Anteil morphologisch normaler Spermatozoen (PM; siehe Abb.6). Die Bedeutung der Spermienmorphologie konnte auch am Beispiel eines Patienten mit einer Globozoospermie (Akrosomkappen-defekt) exemplarisch gezeigt werden; trotz Steigerung der Motilität durch Selektion der progressiv motilen Spermatozoen um das 18- bzw. 29fache kam es zu keiner Fusion mit den Hamstereizellen. Wie bereits unter III.4.1. beschrieben, ergab sich

bei der "swim-up"-Methode keine wesentliche Beeinflussung der Fusionsergebnisse durch die Motilität.



% PM = Anteil morphologisch normal geformter Spermatozoen in %

% HF = Anteil fusionierte Eizellen in %

Abb. 6

P E A R S O N KORRELATIONSKOEFFIZIENTEN

	CE	VE	VE%	CM	VM	FM	HF	MSF	VF	VF%
CE		0.0342 p=0.416	0.0419 p=0.397	0.7404 p=0.001	0.3984 p=0.011	0.2429 p=0.071	0.1429 p=0.214	0.3084 p=0.046	0.1673 p=0.184	0.1303 p=0.231
VE	0.342 p=0.416		0.4315 p=0.002	0.3276 p=0.018	0.2839 p=0.055	0.3852 p=0.009	0.2544 p=0.080	0.0865 p=0.322	0.0001 p=0.500	0.0429 p=0.406
VE%	0.0419 p=0.397	0.4315 p=0.002		0.2726 p=0.042	0.2708 p=0.064	0.3873 p=0.009	0.1850 p=0.155	0.2903 p=0.057	-0.0545 p=0.157	0.1808 p=0.157
CM	0.7404 p=0.001	0.3276 p=0.018	0.2726 p=0.042		0.3518 p=0.022	0.4277 p=0.004	0.2874 p=0.055	0.3060 p=0.047	0.1211 p=0.258	0.2716 p=0.063
VM	0.3984 p=0.011	0.2839 p=0.055	0.2708 p=0.064	0.3518 p=0.022		0.1594 p=0.204	0.0999 p=0.310	0.2236 p=0.147	0.3945 p=0.028	0.1273 p=0.263
FM	0.2429 p=0.071	0.3852 p=0.009	0.3873 p=0.009	0.4277 p=0.004	0.1594 p=0.204		0.5350 p=0.001	0.1829 p=0.176	-0.0253 p=0.449	0.3737 p=0.021
HF	0.1429 p=0.214	0.2544 p=0.080	0.1850 p=0.155	0.2874 p=0.055	0.0999 p=0.310	0.5350 p=0.001		0.1593 p=0.223	-0.2011 p=0.155	0.1881 p=0.155
MSF	0.3084 p=0.046	0.0865 p=0.322	0.2903 p=0.057	0.3060 p=0.047	0.2236 p=0.147	0.1829 p=0.176	0.1593 p=0.223		0.0260 p=0.446	0.1062 p=0.299
VF	0.1673 p=0.184	0.0001 p=0.500	-0.0545 p=0.386	0.1211 p=0.258	0.3945 p=0.028	-0.0253 p=0.449	0.1593 p=0.223	0.0260 p=0.446		-0.0368 p=0.428
VF%	0.1303 p=0.231	0.0429 p=0.406	0.1808 p=0.157	0.2716 p=0.063	0.1273 p=0.263	0.3737 p=0.021	0.1881 p=0.155	0.1062 p=0.299	-0.0368 p=0.428	

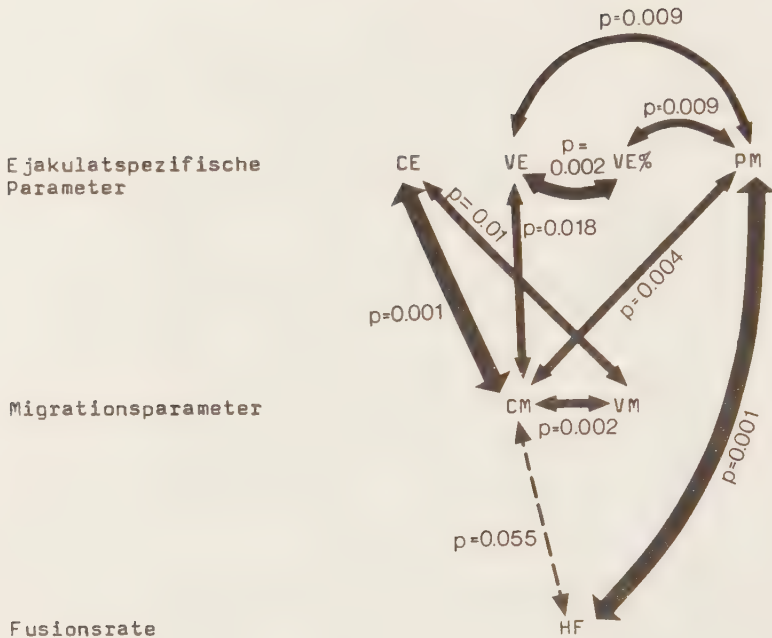
CE = Konzentration der Spermatozoen (Ejakulat)
 VE = Durchschnittsgeschwindigkeit motile Spermatozoen (Ejakulat)
 VE% = Durchschnittsgeschwindigkeit motile Spermatozoen (Ejakulat)
 CM = Konzentration eingewanderte Spermatozoen (stand. Kindermukus)
 VM = Durchschnittsgeschwindigkeit mikrierte Spermatozoen (stand. Kindermukus)
 FM = Anteil morphologisch normale Spermatozoen (in %)
 HF = Anteil fertilisierte Hamstereizellen (in %)
 MSF = Motile Spermienfraktion (swim-up-Methode)
 VF = Durchschnittsgeschwindigkeit motile Spermatozoen (swim-up-Methode)
 VF% = Durchschnittsgeschwindigkeit motile Spermatozoen (swim-up-Methode)

PILOT - STUDIE

	Nativ-ejakulat n = 37	Spermien- suspension "Präzipitat- methode"	Steigerung in %	Nativ- ejakulat n = 41	Spermien- suspension "swim-up"- methode	Steigerung in %
Anteil motiler Spermatozoen (%)	50,8 ± 34%	53,3 ± 32%	4,9	50,3 ± 41%	83,5 ± 21%	66
Durchschnitts- geschwindigkeit mot. Spermatozoen (µm/sec.)	42,3 ± 43%	43,8 ± 42%	3,5	45,3 ± 30%	53,2 ± 31%	17
Durchschnitts- geschwindigkeit aller Spermatozoen (µm%/sec.)	22,13 ± 63%	25,0 ± 56%	13	22,8 ± 60%	45,3 ± 35%	99
Fusionsraten im Hamsteroovum- Penetrationstest (%)		35,9 ± 30%			60,8 ± 47%	

Vergleich von Motilität und Fusionsraten bei unterschiedlicher Spermienpräparation

Tabelle 2



- CE = Konzentration der Spermatozoen im Ejakulat
 VE = Durchschnittsgeschwindigkeit motile Spermatozoen
 VE% = Durchschnittsgeschwindigkeit aller Spermatozoen
 PM = Anteil morphologisch normaler Spermatozoen
 CM = Konzentration migrierte Spermatozoen
 VM = Durchschnittsgeschwindigkeit migrierte Spermatozoen
 HF = Fusionsrate Hamstereizellen

Abb. 7: Beziehungen zwischen Ejakulatparametern, Migrationsparametern und Fusionskapazität

IV. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde ein standardisiertes Testsystem zur Bewertung der Spermatozoenfunktion dargestellt. Durch die Kombination mehrerer Methoden können nähere Informationen über verschiedene Phasen des Befruchtungsvorgangs und ihre mögliche klinische Bedeutung gewonnen werden. Ferner erlauben die Korrelationen zwischen den einzelnen Bestimmungsgrößen Rückschlüsse über funktionelle Zusammenhänge.

Im statistischen Vergleich ließen sich alle untersuchten Funktionen der Spermatozoen über den Rindermukus-Penetrationstest erfassen. So korrelierte die Zahl der eingewanderten Spermatozoen im standardisierten Rindermukus signifikant mit den Parametern Konzentration und Motilität der Spermatozoen im Ejakulat und dem Anteil morphologisch normaler Spermatozoen. Auch andere Untersucher (20) fanden eine Reduktion pathomorphologisch veränderter Spermatozoen im zervikalen Humanmukus. Eine gewisse Korrelation ergab sich auch zwischen der Konzentration der eingewanderten Spermatozoen mit der Fusionsrate beim Hamsterovum-Penetrationstest. Aitken und Mitarbeiter (1) fanden ebenfalls eine Beziehung zwischen Migrations- und Fusionskapazität.

Durch den Hamsterovum-Penetrationstest wird die Fähigkeit des Spermatozoons, Kapazitationsprozeß und Akrosom-

reaktion zu durchlaufen und mit der Eizelle zu fusionieren geprüft. Dies steht nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Motilität der Spermienpopulation, sondern scheint sehr wesentlich von Membranfunktionen im Bereich des Spermienkopfes abhängig zu sein. So fand sich auch eine hoch signifikante Korrelation zwischen den Fusionsraten im Hamsterovum-Penetrationstest und dem Anteil morphologisch normaler Spermatozoen.

Mehrere Untersucher, die den Hamsterovum-Penetrationstest vergleichend bei klinisch fertilen und infertilen Spendern einsetzten, kamen zu dem Ergebnis, daß unterhalb einer Fusionsrate von 10 bis 15 % die hohe Wahrscheinlichkeit klinischer Infertilität besteht (2,7,8,30,33,35,36,45,48). Bei einer Spermatozoenpopulation, die in mehreren Testungen unterhalb dieser Grenze liegt, muß mit einer generellen Störung unterschiedlicher Funktionen gerechnet werden. Dennoch können mit diesem Testsystem auch isolierte pathologische Veränderungen im Bereich des Akrosoms erkannt werden. So konnten wir bei einem Patienten mit einer Globozoospermie (Akrosomkappendefekt) keine Fusion erreichen, obwohl durch die selektive Spermienpräparation die Durchschnittsgeschwindigkeit aller Spermatozoen um das Vielfache gesteigert wurde.

Eine generelle Aussage zur Prognose klinischer Fertilität ist durch den Hamsterovum-Penetrationstest allein

nicht möglich, da wesentliche Spermienfunktionen, wie die Fähigkeit, den weiblichen Genitaltrakt zu durchwandern und die Zona pellucida zu durchdringen, mit diesem Test nicht erfaßt werden. Diese Leistungen sind wesentlich von der Motilität abhängig; insbesondere zur Penetration der Zona pellucida ist eine hohe Progressivmotilität erforderlich (47). Bei der Fusionierung des Spermatozoons mit dem Vitellus spielt die Motilität keine so entscheidende Rolle. Aitken et al. (3) konnten bei einem Patienten mit völlig unbeweglichen Spermatozoen (Kartagener's Syndrom) noch Fusionsraten bis zu 30 % erzielen. Es hat daher nicht überrascht, daß sich zwischen Hamsterovum-Penetrations-test und den Motilitätsparametern keine signifikanten Korrelationen ergaben. Da bei dem dargestellten Testsystem Spermienpopulationen von relativ homogener hoher Motilität eingesetzt wurden, welche durch die "swim-up"-Methode gewonnen wurden, war dies auch schon aufgrund der selektiven Spermienpräparation nicht unbedingt zu erwarten.

Man kann davon ausgehen, daß durch die "swim-up"-Methode Spermatozoen von insgesamt besserer funktioneller Qualität gewonnen und damit auch höhere Fertilisationsraten erzielt werden. Durch reine Präzipitationsverfahren kann nur eine geringe Steigerung des Anteils pro-

gressiv motiler Spermien erreicht werden. Ferner wird durch die "swim-up"-Methode die Filterfunktion des cervikalen Mukus in vitro nachvollzogen. So erwähnt auch Yanagimachi eine reduzierte Zahl pathomorphologisch veränderter Spermatozoen bei Verwendung dieses Spermienpräparationsverfahrens (47). Diese Methode eignet sich daher besonders für die in-vitro-Fertilisation menschlicher Oozyten.

Die Möglichkeiten, unter in-vitro-Bedingungen die Befruchtungsvorgänge zu beeinflussen, dürften bei weiterer Verbesserung der Methodik dazu führen, daß selektive natürliche Barrieren zunehmend in vitro überbrückt werden können. Bei isoliertem tubarem Faktor scheinen die Erfolgsquoten einer extrakorporalen Befruchtung in einen Bereich vorzudringen, der der natürlichen Schwangerschaftsrate bei ungestörter Fertilität entspricht (25). Bei Vorliegen eines ausgeprägten andrologischen Sterilitätsfaktors bestätigen sich die Erwartungen zwar noch nicht (29), durch spezifische methodische Verbesserungen scheint hier jedoch eine gezielte Behandlung andrologischer Funktionsstörungen durch modifizierte in-vitro-Fertilisationsmethoden möglich zu sein. So konnte Cohen et al. (15) bei extrem reduzierten Ejakulatparametern, z.B. bei einer Konzentration von 0,8 Mio. Spermien/ml oder einem

Anteil von lediglich 1 % motiler Spermatozoen durch extrakorporale Befruchtung eine Schwangerschaft erzielen.

Mehrere Gruppen haben inzwischen den Wert des Hamstero-vum-Penetrationstests für die Prognose einer erfolgreichen in-vitro-Fertilisation im Rahmen von IVF-Programmen untersucht (15,18,22,31). So scheint hier teilweise, vor allem in Fällen ausgeprägter andrologischer Funktionsstörung, eine prognostische Aussage möglich (21,41).

Zusätzliche Informationen sind über ein Testsystem mit postmortalen menschlichen Eizellen möglich. Dies wurde in einer parallel laufenden Arbeit (Dissertation Hermann Kurz, München, 1984) untersucht.

Als primäre Untersuchungsmethode - ergänzend zur Ejakulatuntersuchung - scheint aber auch der standardisierte Migrationstest wesentliche Funktionen zu erfassen. Die Beziehungen zwischen Spermienmigration, Spermienmorphologie und Fusionskapazität, die sich im vorliegenden Testsystem ergaben, deuten darauf hin, daß mit dem Migrationstest auch membranspezifische Strukturen mitbeurteilt werden können, die möglicherweise für den regelrechten Ablauf initialer Fertilisationsmechanismen bestimmend sind. Um hier jedoch letztlich einen klaren Nachweis führen zu kön-

nen, sind weitere gezielte funktionelle und biochemische Untersuchungen zur Interaktion detaillierter Membranstrukturen des Spermatozoons mit der Glycoproteinstruktur des cervikalen Mukus oder der Eihülle notwendig.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, durch ein kombiniertes Testsystem nähere Informationen über die Spermatozoenfunktion während verschiedener Phasen des Befruchtungsvorgangs zu erhalten. Dazu wurden folgende Methoden angewandt:

1. Bestimmung der Spermienmotilität durch zeitversetzte mikrographische Photodokumentation; dabei wurden auch die Spermiedichte und -morphologie in üblicher Weise miterfaßt
2. Standardisierter Migrationstest im Rindermukus
3. Heterologer Fusionstest zwischen Humanspermatozoen und Zona-pellucida-freien Hamstereizellen

Es konnte gezeigt werden, daß durch den standardisierten Migrationstest wesentliche Funktionen der Spermatozoen primär erfaßt werden können. Diese Methode ist ergänzend zur Ejakulatuntersuchung als Basistest für die Sterilitätsdiagnostik geeignet.

Unter anderem ergaben sich enge Beziehungen zwischen der Pathomorphologie der Spermatozoen und der Spermienmigration bzw. der Fusionskapazität der Spermatozoen.

Beim Vergleich unterschiedlicher Spermienpräparationsverfahren ergab sich ferner, daß durch selektive Präparationsmethoden eine deutliche Steigerung der Spermienmotilität und auch der Fusionskapazität erreicht werden kann. Damit scheint eine gezielte Behandlung andrologischer Fertilitätsstörungen unter in-vitro-Bedingungen möglich zu sein.

LITERATURVERZEICHNIS

=====

1. Aitken R.J., Best F.S.M., Richardson D.W., Djahanbakhch O., Lees M. (1982b): The correlates of fertilizing capacity of normal fertile men. *Fertil.Steril* 38, 68
2. Aitken R.J., Templeton A., Schats R., Best F., Richardson D., Djahanbakhch and Lees M. (1983): Methods for assessing the functional capacity of human spermatozoa; their role in the selection of patients for in vitro fertilization. Beier H.M., Lindner H.R. (eds.): *Fertilization of the human Egg in Vitro*, Springer, Berlin-Heidelberg-New York-Tokio, 147
3. Aitken R.J., Ross A., Lees M. (1983c): Analysis of sperm function in Kartagener's syndrome. *Fertil.Steril.* 40, 696
4. Austin C.R. (1951): Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Scient. Res.* 84, 581
5. Austin C.R.: Sperm capacitation-biological significance in various species (1969a): *Advance in Biosciences*, 4, 5
6. Barros C. & Yanagimachi R. (1972): Polyspermy-preventing mechanisms in the golden hamster egg. *J. of Experimental Zool.*, 180, 251
7. Barros C., Gonzalez J., Herrera E., Bustos-Obregon E. (1978): Fertilizing capacity of human spermatozoa evaluated by actual penetration of foreign eggs. *Contraception* 17, 87

8. Barros C., Gonzalez J., Herrera E., Bustos-Obregon E. (1979): Human sperm penetration into zona-free hamster oocytes as a test to evaluate the sperm fertilizing ability, *Andrologia* 11, 197
9. Barros C., Vigil P., Herrera E., Perez A., Guadarrama A., Bustos-Obregon E. (1983): In vitro interaction between human spermatozoa and human cervical mucus. *Microscop Electronic Bio.Celul.* 7, 13
10. Bedford J. M. and Cooper G.W. (1978): Membrane fusion events in the fertilization of vertebrate egg. In: *Membrane Fusion* (G. Poste and G.L. Nicholson, eds.), North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1
11. Biggers J.D., Whitten W.K., Whittingham D.G. (1971): The culture of mouse embryo in vitro. In Daniel J.C. (ed.): "Methods in Mammalian Embryology." San Francisco: Freeman, 86
12. Brandiff B., Gordon L., Watchmaker G., Summers L., Wyrobeck A. (1982): Gamete interaction and developmental progression to the 2-cell stage in the human sperm/hamster egg interspecific cross. *J.Cell Biol.* 95, 154
13. Chang M.C. (1969): Hormonal regulation of sperm capacitation. *Advances in the Biosciences*, 4, 13
14. Chang M.C. & Hunter R.H.F. (1975): Capacitation of mammalian sperm: Biological and experimental aspects. *Handbook of Physiology*, sec. 7, Vol. 5 (Male reproductive system), Greep R.O. (ed.), Washington: American Physiology Society, 339
15. Cohen J., Webber R.F.A., Van der Vijer J.C.M., Zeilmaker G.H. (1982): In vitro fertilizing capacity of human spermatozoa with the use of zona-free hamster ova: Interassay variation and progn.value. *Fertil.Steril.* 37, 565

16. Cohen J., Fehilly C.B., Fishel S.B., Edwards R.G., Hewitt J., Rowland G.F., Steptoe P.C. & Webster J.C. (1984): Male infertility successfully treated by in-vitro-fertilization. *Lancet* 1, 1239
17. Edwards R.G., Steptoe P.C., Purdy J.M. (1978): Fertilization and cleavage in vitro of preovulation human oocytes. *Nature*, 227
18. Foreman R., Cohen J., Fehilly C.B., Fishel S.B., Edwards R.G. (1984): The application of the zona-free hamster egg test for the prognosis of human in vitro fertilization. *J. of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, Vol. 1, No. 3, 166
19. Fritz H., Schleuning W.-D., Schiessler H., Schill W.-B., Wendt V., Winkler G. (1975): Boar, bull and human sperm acrosin - isolation, properties and biological aspects. In: *Proteases and Biological Control*. Eds.: Reich E., Rifkin D.B., Shaw E. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 715
20. Glezerman M., Perry G. and Insler V. (1977): Selective Filtration of Abnormal Spermatozoa by the Cervical Mucus in Vitro. In: *The Uterine Cervix in Reproduction*. Eds.: Insler V. and Bettendorf G., Georg Thieme Publishers, Stuttgart, 118
21. Grobstein C., Flower M., Mendeloff J. (1983): External human fertilization: An evaluation of policy. *Science* 222, 127
22. Hall J.L., Sloan C.S., Hammond M.G. (1980): Correlation of heterologous in vitro fertilization using human sperm and hamster ova with clinical evaluation of male infertility. *Fertil.Steril.* 33, 238

23. Hoshi K., Nagaike F., Momono K., Kyono K., Tsuiki A., Saito A., Suzuki M., Hayashi K., Yanagimachi R. (1983): A "layering method" to separate a population of good spermatozoa from semen sample. Jpn.J.Fertil.Steril. 28, 101
24. Jeyendran R.S., Van der Ven H.H., Kennedy W.P., Heath E., Perez-Pelaez M., Sobrero A.J., Zaneveld L.J.D. (1983): Biochemical properties and oocyte penetration of acrosome-less human spermatozoa. J.Androl. 4, 40
25. Jones H. W., Acosta A.A., Andrews M.C., Garcia J.E., Jones G.S., Mantazavinos R., McDowell J., Sandow B.A., Vecck L., Whiblex T.W., Wilkes C.A., Wright G.L. (1983): What is a pregnancy? A question for programs of in vitro fertilization. Fertil.Steril. 40, 728
26. Katz D.F., Overstreet O.W., Hanson F.W. (1980): A new quantitative test for sperm penetration into cervical mucus. Fertil.Steril. 33, 179
27. MacLeod J., Gold R.Z. (1951): The male factor in fertility and infertility. II. Spermatozoon counts in 1000 men of known fertility and in 1000 cases of infertile marriages. J.Urol. 66, 436
28. MacLeod J., Gold R.Z. (1951): The male factor in fertility and infertility. IV. Sperm morphology in fertile and infertile marriages. Fertil.Steril. 2, 394
29. Mahadevan M.M., Trownson A.O., Leeton J.F. (1983): The relationship of tubal blockage, infertility of unknown cause, suspected male infertility and endometriosis to success of in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil.Steril. 40, 755

30. Margalioth E.J., Laufer N., Navot D., Voss R., Schenker J.S. (1983): Reduced fertilization ability of zona-free hamster ova by spermatozoa from male partners of normal infertile couples. Arch.Androl. 10, 67
31. Matson P.L., Vaid P., Sutherland P.D., Collins W.P., Pryor J.P. (1984): How useful is the heterologous ovum penetration test in assessing male fertility. J.of in Vitro Fert. and Embryo Transfer, Vol. 1, No. 2, 125
32. Overstreet J.W., Katz D.F., Hanson F.W., Fonseca J.R. (1979): A simple inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics. Fertil.Steril., Vol. 31, No.2, 162
33. Overstreet J.W., Yanagimachi R. et al. (1980): Penetration of human spermatozoa into the human zona pellucida and the zona-free hamster egg: A study of fertile donors and infertile patients. Fertil.Steril.33, 534
34. Pavlok A. (1979): Interspecies interaction of zona-free ova with spermatozoa in mouse, rat and hamster. Anim. Reprod.Sci. 2, 395
35. Rogers B.J., Van Campen H., Ueno M., Lambert H., Bronson R., Hale R. (1979): Analysis of human spermatozoa fertilizing ability using zona-free ova. Fertil.Steril. 32, 664
36. Rogers B.J., McCarville C., Soderdahl D., Hale R. (1982): Re-evaluation of the zona-free egg test with regard to its use in human fertility assessment. Fertil.Steril 37, 296
37. Rogers B.J., Bertwood B.J., Van Campen H., Helmbrecht G., Soderdahl D., Hale R. (1983): Sperm morphology assessment as an indicator of human fertilizing capacity. J.Androl. 4, 119

38. Saito A., Hoshi K., Suzuki M., Hayashi K., Yanagimachi R.
(1984): Capacitation time of human spermatozoa.
Jpn.J.Fertil.Steril. 29, 88
39. Soupart P. (1972): Sperm capacitation; Methodology, hormonal control and the search for a mechanism. Biology of Mammalian Fertilization and Implantation, ed. Moghissi K.S. & Hafez E.S.E., 54
40. Soupart P., Strong P.A. (1974): Ultrastructural observations on human oocytes fertilized in vitro. Fertil.Steril. 25, 11
41. Trounson A., Wood C. (1981): Extracorporal fertilization and embryo transfer. Clin.Obstet.Gynecol. 8, 681
42. Weissenberg R., Eshkol A., Rudak E., Lunenfeld B. (1982): Inability of round acrosomeless human spermatozoa to penetrate zona-free hamster ova. Arch.Androl. 11, 167
43. Yanagimachi R., Noda Y.D. (1970a): Electron microscope studies of sperm incorporation into the golden hamster egg. Am.J.Anat. 128, 429
44. Yanagimachi R., Noda Y.D. (1970b): Physiological changes in the post-nuclear cap region of mammalian spermatozoa: A necessary preliminary to the membrane fusion between sperm and egg cells. J. Ultrastruct Res. 31, 486
45. Yanagimachi R., Yanagimachi H. & Rogers B.J. (1976): The use of zona free animal ova as a test system for the assessment of fertilizing capacity of human spermatozoa. Biology of Repr. 15, 471

46. Yanagimachi R. (1977): Specificity of sperm-egg-interaction.
In Edidin M., Johnson M.H. (eds.): "Immunobiology
of Gametes". London: Cambridge University Press,
255
47. Yanagimachi R. (1984): Zona-free hamster eggs: Their use
in assessing fertilizing capacity and examining
chromosomes of human spermatozoa. Gamete Research 10,
187
48. Zausner-Guelman B., Blasco L., Wolf D.P. (1981): Zona-
free hamster eggs and human sperm penetrations
capacity: A comparative study of proven fertile
donors and infertile patients. Fertil.Steril. 36,
771
49. Zuckerman Z., Rodriguez-Rigau L.J., Smith K.D., Steinberger E.
(1977): Frequency distribution of sperm counts in
fertile and infertile males. Fertil.Steril. 28,
1310

Tabellarischer Lebenslauf

12. 3. 1947 in München als Tochter des Inspektors Adolf Langgartner und seiner Ehefrau Marianne geboren
- 1953 - 1960 Besuch der Volksschule in München
- 1960 - 1963 Besuch der Städt. Riemerschmid-Handels-
schule in München mit dem Abschluß der
mittleren Reife
- 1963 - 1971 Tätigkeit im kaufmännischen Beruf
- 1972 - 1974 Erwerb der Hochschulreife auf dem
2. Bildungsweg (München-Kolleg)
- 1975 - 1982 Studium an der Ludwig-Maximilians-
Universität in München
4. 11. 1982 Ablegung des 3. Abschnitts der ärzt-
lichen Prüfung
- 25.11. 1982 Erteilung der Approbation
1. 5. 1983 - Stationsärztin in der Höhenklinik
30. 6. 1985 Bischofsgrün
- seit 4.11.85 Angestellte Ärztin am Gesundheitsamt
Eichstätt, Dienststelle Ingolstadt

